

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-074198

(43)Date of publication of application : 09.03.1992

(51)Int.Cl.

C07K 7/10
// A61K 37/24
A61K 37/24
C07K 99:00

(21)Application number : 02-186582

(71)Applicant : MATSUO TOSHIYUKI

(22)Date of filing : 13.07.1990

(72)Inventor : MATSUO TOSHIYUKI
SAGAWA KENJI
MINAMINO NAOTO

(54) SWINE DERIVED NEW PHYSIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDE (CNP-53)

(57)Abstract:

NEW MATERIAL: A peptide having an amino acid sequence shown by the formula [(1) and (2), (3) and (4), (5) and (6), (7) and (8) and (9) and (10) are directly bonded and cysteine residues (Cys) at the 37-position and the 53-position form S-S bonds in the molecule].

USE: An antihypertensive agent and natriuretic.

PREPARATION: For example, swine brain is extracted, finely cut, treated with boiling water for 5 minutes, deactivated with protease, homogenized by a mixer, centrifuged, the supernatant liquid is collected, concentrated, mixed with acetone, formed precipitate is removed, the supernatant liquid is treated with a silica gel, adsorbed material is eluted, an eluted solution is concentrated, subjected to gel filtration and to treatment with a column having an immobilized antibody against atrial natriuretic peptide (ANP) and purified to give C-type natriuretic peptide (CNP).

8-Arg-Lys-Phe-Gln-Gln-Thr-Lys-Ser-Arg (1)
(2) ¹Asp-¹Asp-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-Arg-Lys-Lys-Arg-Gly (2)
(3) ¹Asp-¹Asp-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-Arg-Lys-Lys-Arg-Gly (3)
(4) ¹Asp-¹Asp-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-Arg-Lys-Lys-Arg-Gly (4)
(5) ¹Asp-¹Asp-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-Arg-Lys-Lys-Arg-Gly (5)
(6) ¹Asp-¹Asp-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-Arg-Lys-Lys-Arg-Gly (6)
(7) ¹Asp-¹Asp-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-Arg-Lys-Lys-Arg-Gly (7)
(8) ¹Asp-¹Asp-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-Arg-Lys-Lys-Arg-Gly (8)
(9) ¹Asp-¹Asp-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-Arg-Lys-Lys-Arg-Gly (9)
(10) ¹Asp-¹Asp-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-Arg-Lys-Lys-Arg-Gly (10)

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑩ 日本国特許庁 (J P)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A) 平4-74198

⑬ Int. Cl.⁵
C 07 K 7/10
// A 61 K 37/24
C 07 K 99:00

識別記号
ZNA
ABU
ACX

庁内整理番号
8318-4H
8317-4C
8317-4C

⑭ 公開 平成4年(1992)3月9日

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全11頁)

⑮ 発明の名称 ブク由来新規生体活性ペプチド (CNP-53)

⑯ 特 願 平2-186582

⑰ 出 願 平2(1990)7月13日

⑱ 発 明 者 松 尾 壽 之 大阪府箕面市小野原東5丁目5-15-141
⑱ 発 明 者 寒 川 賢 治 宮崎県宮崎郡清武町加納甲1520番地の24
⑱ 発 明 者 南 野 直 人 大阪府吹田市香山台3丁目50, D-10-303
⑲ 出 願 人 松 尾 壽 之 大阪府箕面市小野原東5丁目5-15-141
⑲ 代 理 人 弁理士 湯浅 恭三 外4名

明 細 書

1. (発明の名称)

ブク由来新規生体活性ペプチド (CNP-53)

2. (特許請求の範囲)

1. 下記のアミノ酸配列で表わされるペプチド。

- $\text{H-Asp-Leu-Arg-Gly-Asp-Tyr-Lys-Ser-Arg-(1)}$
 $\text{(2) Ala-Ala-Tyr-Ala-Arg-Leu-Leu-His-Gly-(3)}$
 $\text{(4) His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-(5)}$
 $\text{(6) Gly-Asn-Lys-Lys-Gly-Leu-Ser-Lys-Gly-(7)}$
 $\text{(8) Cys-Phe-Gly-Leu-Lys-Leu-Asp-Arg-Ile-(9)}$
 $\text{(10) Gly-Ser-Met-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys-OR}$

(式中、(1)と(2)、(3)と(4)、(5)と(6)、(7)と(8)、
(9)と(10)は直接結合しており、37位と38位のシ
ステイン残基(Cys)は分子内でS-S結合を形成
している。)

2. 下記のアミノ酸配列で表わされるペプチド。

- $\text{H-Gly-Leu-Ser-Lys-Gly-Cys-Phe-Gly-Leu-Lys-(1)}$
 $\text{(2) Leu-Asp-Arg-Ile-Gly-Ser-Met-Ser-Gly-Ile-(3)}$
 (4) Gly-Cys-OR

(式中、(1)と(2)、(3)と(4)は直接結合しており、6

位と22位とのシステイン残基(Cys)は分子内でS-S結合を形成しており、Xは次式

- $\text{H-Ala-Asp-Tyr-Lys-Ser-Arg-(1')}$
 $\text{(2') Ala-Ala-Tyr-Ala-Arg-Leu-Leu-His-Gly-(3')}$
 $\text{(4') His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-(5')}$
 $\text{(6') Gly-Asn-Lys-Lys-}$
 H-Ser-Arg-(3')
 $\text{(2') Ala-Ala-Tyr-Ala-Arg-Leu-Leu-His-Gly-(3')}$
 $\text{(4') His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-(5')}$
 $\text{(6') Gly-Asn-Lys-Lys-}$
 $\text{H-Ala-Ala-Tyr-Ala-Arg-Leu-Leu-His-Gly-(3')}$
 $\text{(4') His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-(5')}$
 $\text{(6') Gly-Asn-Lys-Lys-}$

- $\text{H-Leu-Leu-His-Gly-(3')}$
 $\text{(4') His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-(5')}$
 $\text{(6') Gly-Asn-Lys-Lys-}$

H-Tyr-Lys-Gly-Gly-Asn-Lys-Lys-。又は

H-Gly-Gly-Asn-Lys-Lys-

(式中、(1')と(2')、(3')と(4')、(5')と(6')は直接結合しているものである)で表わされるいずれかの

ペプチドである)。

3. (発明の詳細な説明)

発明の背景

本発明は、ブタ由来のβ-NP (β-type atriopeptide) に属する神経伝達物質ペプチドに関し、特に神経には53個のアミノ酸残基から成るペプチド及びそのペプチド誘導体に関する。

発明の意義

近年、哺乳類の心臓及び脳から、体液及び血液の循環性を調節しているホルモンとして、心臓性ナトリウム利尿ペプチド(atrial natriuretic peptide: ANP)と脳ナトリウム利尿作用ペプチド(brain natriuretic peptide: BNP)とを有する二種類のタイプの異なるペプチドホルモン類が発見され、その構造及び生体作用機構が明らかにされ、また、それらの生体作用についても明らかにされてきた。

ANP発見後の最初の年がかりは、1981年 de Boldらにより提供された。すなわち、彼らはラット心臓前庭後葉を溶出液のラットに注射すると著しい

利尿作用、なら、γ-ANPの生体作用機構が明らかとなり、これらはいずれも共通の細胞体タンパク質から生体作用することが判った(Debold, S. et al., Nature, 302, 724, 1984)。

なお、これらのANPのうちγ-ANPが主に血液中に分泌されていることが判っている。

γ-ANPの構造が明らかにされて以来、現在までに他の哺乳類のANP構造も明らかにされてきている。この結果、ANPのアミノ酸配列は、げっ歯類からヒトまで哺乳類動物において広い範囲で類似しており、特にα-ANP (α-ANP) はヒト・イヌ・ブタを含む高等哺乳類においては同一のアミノ酸配列を持つこと、また、ラット及びウサギではγ-ANPの12位メチオニン残基がイソロイシン残基に置換している一箇所以外全く同一のアミノ酸配列を有していることが判ってきている(Debold, S. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 122, 852, 1985; Forrester, N. G. et al., Anat. Embryol., 152, 337, 1983)。

最初ANPは心臓より単離されたが、ANPに

利尿作用を示すことを見いだし、心臓中にナトリウム利尿を促進する因子が存在していることを報告した(De Bold, S. J. et al., Life Sci., 22, 83, 1981)。その後、この因子は藤川らによりヒト心臓より単離、その構造が明らかにされ、心臓性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)と命名された。

(Kangawa, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112, 151, 1983; Kangawa, K. et al., Nature, 312, 557, 1985)。ヒトANP (ヒトANP) は心臓において分子量の異なる二種類の、すなわちα型、β型、およびγ型が存在しており、α型ANP (α-ANP) は分子内に1個のC-末端を有した28個のアミノ酸からなる一本鎖ペプチドであること、β型ANP (β-ANP) はα-ANPが分子内でC-末端部分を形成した逆平行の二重鎖であること、γ型ANP (γ-ANP) は28個のアミノ酸からなる高分子量物質で、そのC-末端部分にα-ANPを含んでいることが明らかにされた。さらに、γ-ANPに処理するとβ-NPが単離され、この実験

に対する抗体を特異的に、生体内における分布を調べたところ、ANPは心臓以外にも脳にも存在していることが判った。脳では視床下部、視床蓋 (positive tegmentum) にANPを含有ニューロンの存在が報告されていることから (Costa, S. et al., Histochemistry, 80, 113, 1984; Saper, C. B. et al., Science, 221, 1047, 1985)、ANPは現在脳において心血管系の調節にかかわる神経伝達物質としても作用しているのではないかと考えられている。

ANPの生体作用は前にも述べたが、重要なナトリウム利尿作用を示すのみならず、血圧降下作用さらには脳血管のアルドステロン産生を抑制することが判ってきた。従って、血中ANPは心臓から血液中に分泌され、体液及び血液の循環性を調節するホルモンとして作用するのみならず、脳では神経系の神経伝達物質として作用し、体液及び血圧の循環性を調節していることが判ってきた。

一方、BNPは1983年Sadoshらによりブタ脳から単離・同定されたペプチドである(Sadosh, J.

et al., Nature, 222, 78, 1968).
 Bloch により最初にブタ脳から単離された BNP (オキシド-22) は分子内に 1 個のシ-ス結合を持つアミノ酸残基よりなるペプチドであり、その構造、すなわちアミノ酸一次配列、及びシ-ス結合構造 (アミノ酸残基で構成される環状構造) は ANP と似ているが、ANP とは明らかに区別されるペプチドである。さらにこのペプチドは ANP と同様、ナトリウム利尿作用及び血圧降下作用を示すことが観察されたことから、このペプチドは脳ナトリウム利尿ペプチド (BNP) と命名された。その後、ブタ脳から BNP-22 の C-末端残りの 22 のアミノ酸が付加した 32 アミノ酸残基のものを BNP-32 と単離され (Satch, T. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 122, 726, 1985)。さらにブタ心臓より A-ANP と命名されたアミノ酸 168 個からなるペプチドも単離・同定されている (Mason, R. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 121, 402, 1985)。これらの結果、これら BNP ペプチド類は ANP

とは全く異なる種類の分子から生成されることを示した。さらに観察されたことは、BNP の C-末端残基が A-ANP の C-末端残基と類似した構造を有していること (Satch, T. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 122, 1427, 1985; Satch, T. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 122, 1428, 1985)。
 前述したように、BNP は脳組織より単離されたが、ブタ脳において BNP は ANP に比べ 10 倍量存在していること、さらに BNP と同様心臓にも存在し (ただし、心臓での BNP の存在量は ANP の 2-3 倍)、心臓から血中へ分泌されていることが判った (Mason, R. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 122, 740, 1985; Abrams, R. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 125, 272, 1985)。これらの事実から、BNP は ANP と同様、脳においては降圧性物質として、また心臓から血中へ分泌されるホルモンとして作用し、体液及び血圧の恒常性を調節していることが判った。

以上の結果をみると、現在までのところ哺乳動物においては、少なくとも 2 タイプの異なる種類のペプチド (ANP ファミリー、BNP ファミリー) のペプチド類が存在し、これらはいずれも心臓から血中へ分泌され、体液及び血圧の恒常性を調節する働きを有しているもののみならず、これら両方とも生命維持、調節系の機能性物質として作用し、体液及び血圧の恒常性を調節していることが判ってきた。

ところで、ナトリウム利尿ペプチドのように、体液を減少させる生理的作用 (例えば、体液及び血圧の低下) の調節に単一ペプチドではなく、複数のペプチドが関与している例として、現在までオキシド-1 ペプチド (Oxid peptide)、タキチン (tachykin) あるいはエンドセリン (endoselin) などが知られている。これらの例では、いずれも複数の異なるペプチドファミリーが存在していることが知られている (Satch, T. et al., Trends Neuro Sci., 11, 24, 1986; Kawanishi, E. Physiol. Review, 67, 1117, 1987; Inoue, A. et al., Proc.

Natl. Acad. Sci. U. S. A., 82, 2823, 1985)。このことから、ナトリウム利尿作用を示すペプチドも現在まで知られている ANP、BNP ファミリー以外に他のファミリーに属するペプチド類が存在している可能性が示された。この点に關し、本発明者は、広く検索した結果、ナトリウム利尿ペプチドの第 2 のファミリーに属する脳型ペプチドを単離・同定することに成功し、このペプチドを CNP (C-type natriuretic peptide) と命名した (以後、本発明でこのペプチドを CNP-22 と略す)。CNP-22 はアミノ酸残基 22 個からなるペプチドで、ANP・BNP 同様分子内に 1 個のシ-ス結合を持つ環状構造を形成している。この環状構造は ANP・BNP と同様 17 アミノ酸残基で構成されており、さらにこの環状構造を形成しているアミノ酸一次配列の相似性は CNP-22 と A-ANP・BNP-22 の環と高い。しかし、CNP-22 の C-末端部分の構造は ANP・BNP のそれとは大きく異なっている。すなわち、ANP・BNP の C-末端部分の構造は、環状構造

を形成しているヌクレオチド配列に基いて、ヌクレオチド配列が決定した後に構造を導いているものに対し、C/NターミナルのC-末端は22個のアミノ酸残基であり、C/NターミナルのN-末端は22個のアミノ酸残基である。このことから、C/Nターミナルは構造上、アミノ酸残基の配列が決定しているが、これは明らかに異なる2つのファミリーに属するペプチドであることが示された。また、C/Nターミナルをラベルして観察すると、アミノ酸残基の配列が決定した後に、配列が決定した後に、C/Nターミナルは構造上、アミノ酸残基の配列が決定しているが、これは明らかに異なる2つのファミリーに属するペプチドであることが示された(特開平2-103047号)。

本発明が解決すべき課題

従って、本発明では構造上におけるナトリウム

イオンを必要としないC/NターミナルのC-末端は22個のアミノ酸残基であり、C/NターミナルのN-末端は22個のアミノ酸残基である。このことから、C/Nターミナルは構造上、アミノ酸残基の配列が決定しているが、これは明らかに異なる2つのファミリーに属するペプチドであることが示された(特開平2-103047号)。

ここで、本発明では構造上におけるナトリウムイオンを必要としないC/NターミナルのC-末端は22個のアミノ酸残基であり、C/NターミナルのN-末端は22個のアミノ酸残基である。このことから、C/Nターミナルは構造上、アミノ酸残基の配列が決定しているが、これは明らかに異なる2つのファミリーに属するペプチドであることが示された(特開平2-103047号)。

新規ペプチドの配列のファミリー、すなわちC/Nターミナルに属し、先に構造・配列したC/NターミナルのC-末端は22個のアミノ酸残基であり、C/NターミナルのN-末端は22個のアミノ酸残基である。このことから、C/Nターミナルは構造上、アミノ酸残基の配列が決定しているが、これは明らかに異なる2つのファミリーに属するペプチドであることが示された(特開平2-103047号)。

本発明が解決すべき課題

本発明では、先に構造・配列したC/NターミナルのC-末端は22個のアミノ酸残基であり、C/NターミナルのN-末端は22個のアミノ酸残基である。このことから、C/Nターミナルは構造上、アミノ酸残基の配列が決定しているが、これは明らかに異なる2つのファミリーに属するペプチドであることが示された(特開平2-103047号)。

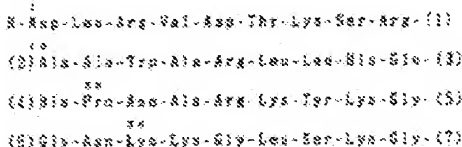
本発明では、先に構造・配列したC/NターミナルのC-末端は22個のアミノ酸残基であり、C/NターミナルのN-末端は22個のアミノ酸残基である。このことから、C/Nターミナルは構造上、アミノ酸残基の配列が決定しているが、これは明らかに異なる2つのファミリーに属するペプチドであることが示された(特開平2-103047号)。

アミノ酸は検出されないことから、本発明ではこのヌクレオチド配列のファミリーと関係した。なお、この配列で45サイクル以後のヌクレオチド配列は検出されなかったが、配列するに足らなかった。次に、このペプチドのC-末端は22個のアミノ酸残基であり、C/NターミナルのN-末端は22個のアミノ酸残基である。このことから、C/Nターミナルは構造上、アミノ酸残基の配列が決定しているが、これは明らかに異なる2つのファミリーに属するペプチドであることが示された(特開平2-103047号)。

はならない。さらに、本発明におけるペプチドが、CNP-22のC-末端に含む53アミノ酸残基よりなるペプチドであるとするならば、本発明におけるペプチドの該CNP-22残基域に対する1分子あたりの免疫活性が、CNP-22のそれと同等である効果をよく説明することができる。

尚、このCNP-53においてエドマン法によって解明できなかったC末端部分の8個のアミノ酸配列については、CNP-53をコードするcDNAのクローニングによる推定された(第6図)、このクローニングに関しては発明者等の岡田法隆の明細書に詳述した。

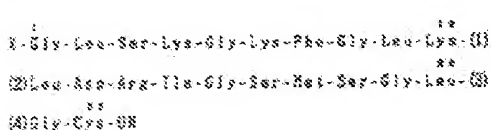
以上の事実により、本発明者は最終的に、本発明で製剤したペプチドの構造は以下のアミノ酸一次配列で示される新規ペプチドであると結論した。



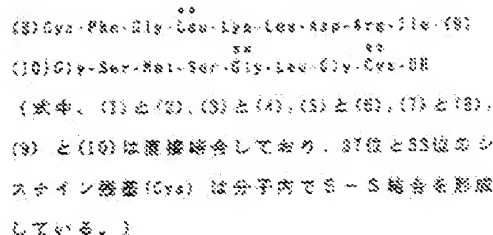
F-53は、ブタ種においてただ単にCNP-22の前駆ペプチドとして存在している可能性がある。しかし、本発明の発露例で示すように、ブタ種におけるCNP-53の含量は、CNP-22より多く存在していることから、CNP-53はただ単にCNP-22の前駆ペプチドとして体内に存在しているだけでなく、CNP-53それ自身が直接脳内で作用や受容の活性化を誘起している可能性が高い。

CNP-53のペプチドのN末端から31個のアミノ酸のうち塩基性アミノ酸はプロセッシングを受け易い。従って、CNP-22のN末端に類似アミノ酸が付加した何種類かのペプチド誘導体が生成されるものと考えられる。

これらのペプチド誘導体としては下記のアミノ酸配列で表わされるペプチド類が含まれる。



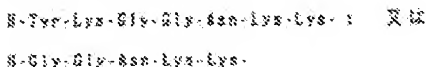
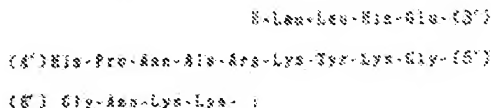
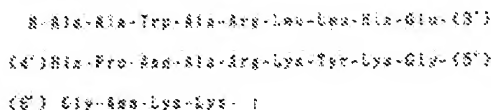
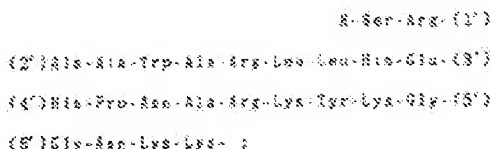
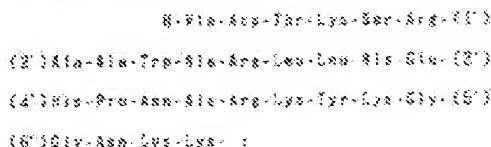
(式中、(1)と(3)、(3)と(4)は直接結合しており、6



なお、本明細書においてこのペプチドをCNP-53と称する。

CNP-53の構造は、第5図に示すように、C末端部分にCNP-22と同一のアミノ酸配列を持っている。言い換えれば、CNP-53は先に単離・測定したCNP-22のN-末端に31アミノ酸残基が付加したペプチドである。さらに、CNP-53のCNP-22に対応する部分のすぐN-末端部分(CNP-53の33位と34位)にLys-Lys配列が存在していることから(この配列は多くのペプチドホルモンの生合成において、前駆体タンパクから最終ペプチドホルモンが生ずる場合のプロセッシング酵素の認識及び切断部位であることが知られている)、本発明において単離・測定したCNP

位と33位とのシステイン残基(Cys)は分子内でS-S結合を形成しており、Xは次式



(式中、(1')と(2')、(3')と(4')、(5')と(6')は直接結合しているものとする)で表わされるい

たものペプチドである)。

以上述べたように、本発明では、ブタの脳から抗CNP-22抗血清をも用いたR1A系を後述にC12ラファミリンに属する新規ペプチドの単離・同定を行った結果、抗CNP-22抗血清に対し免疫反応性を示すペプチドを、単一で純粋な状態まで精製することに成功し、さらにこのペプチドの構造解析を行ったところ、このペプチドがCNP-22をC-末端部分を含むミノ酸53残基よりなり利尿作用及びナトリウム利尿作用を有するペプチドであることを思いだし、本発明を完成した。

以下、実施例により本発明を詳細に説明する。

実施例1. 抗CNP-22抗血清の作製及び

R1A系の構築

A. 抗CNP-22抗血清の作製

5%の化学合成したCNP-22とウシ・サイログロブリン(hydrogelatin, シグマ社製) 15%とを5%の0.1Mリン酸バッファー(pH 7.4)に溶解し、この溶液に100μlの5%グルタルアルデヒドを加え、0度で30分間攪拌することにより、CNP-

(Tyr¹) CNP-22を直接NPLCを用いて分離・単離した。

次に、このようにして作製した¹²⁵Iでラベルした(Tyr¹) CNP-22と実施例1. Aで作製した抗体(171-4)を用いR1Aの系を以下に示す方法で構築した。

すなわち、R1A系のbufferは、86mM NaCl, 0.1M Tris-HCl-102, 35mM EDTA, 0.05% NaN₃, 3.1%デキストラン T-40, 0.25%BSA (N-エチルマレインイミド(N-ethylmaleimide)処理したもの)を含む、50mMリン酸バッファー(pH 7.4)を用いた、スタンダードCNP-22溶液またはアセチサノブール(100μg)と融合した方法で作製した抗体が171-4 (60000倍希釈したものを100μl)を加え、4度で24時間反応する。24時間後、トレーサー(¹²⁵Iでラベルした(Tyr¹) CNP-22) 100μlを加え、4度で30時間反応した後、ポリエチレングリコールを加え、生じた沈殿のラジオアクティビティ(radioactivity)をgamma カウンター(GSC-500, Aloka)で測定した。

22をサイクロドロブリンに結合させる。次に、この溶液を水(500μl)に対し5倍、50mM NaClを含む50mMリン酸バッファー(pH 7.4) 500μlに対し2回透析することにより、反応溶液中の過剰の塩及び試薬を除いた。さらに、この反応後に50mM NaClを含む50mMリン酸バッファーを加え、全量を12μlとした後、等量のFressad's コンプリートアジュバントを加えエマルジョンを形成し、これをウサギ(New Zealand White)に20日おきに繰り返し免疫することにより、抗CNP-22抗血清を得た。

なお、このようにして得た抗CNP-22抗血清は171-4と命名した。

B. R1A系の構築

まず、(Tyr¹) CNP-22 (CNP-22のN-末端にタイロシン残基(Tyr) を付加したペプチド) を化学合成し、このN-末端Tyr残基にNiyataらの方法(Niyata, A. et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 123, 246-253, 1985)を用いて¹²⁵Iを導入し、¹²⁵Iでラベルされたanalog

このR1A系を用いると、1~100fmol/100μlのCNP-22が検定できる。抗体が171-4のα-A-NP、β-B-NP-22に対する交叉反応(cross-reactivity)は、それぞれ0.015%, 0.46%であった。

実施例2. CNP-22の単離・精製

ブタ430匹から40kgの脳を抽出し、切断した後、プロテアーゼを不活性化するために200mMの濃度で5分間処理する。冷却後氷時温度を最終濃度が1Mになるように加え、この組織をポリトロンミキサーを用いてホモジナイズする。次に、このホモジネイトを遠心分離することにより、沈殿成分と上清成分に分け、この上清成分をcellulose cassettes (PCAC 4000-05, Millipore)を用いて精製する。この精製液にアセトンを加え(最終濃度60%), 生じた沈殿を遠心操作で除去し、上清を減圧濃縮した。ここで得られた濃縮液を0.5M酢酸に溶かし、4割に分けてC-18シリカゲルカラム(1.5g容量, LC-500R SP4-C-003, Gennex社製)にカラムに吸着したペプチドを水・アセチトリオール(78:20)・15%トリフルオロ酢酸(TFA)が1~60%になる

るようにならした状態で溶出し、この溶出液を濃縮することにより、乾燥重量25gのペプチドを含むする溶液を得た。このうち1/2量を1M酢酸に溶かし、1M酢酸で平衡化したシリカゲル・オクタデシルスルホニウム(8-*octadecyl*, $3 \times 38 \text{ cm}$)を用いたイオン交換クロマトグラフィーにかけ、カラムに吸着したペプチドを1M酢酸、2Mピリジン及び2Mピリジン-酢酸(pH 5.0)を用いて順次溶出した。このようにして得られた各成分は、それぞれ、3F-1、3F-2、3F-3成分と名付け、凍結乾燥した。本発明におけるCNP-22の精製はこの3F-3成分を出発原料として用いた。なお、前記したF1Aの系で抗CNP-22血清に免疫反応を示すペプチドの系と見れば、この3F-1成分が含まれていることが判った。

まず、3F-3成分(乾燥重量5.2g)をセファデックスG-50カラム(100, $7.5 \times 145 \text{ cm}$, フォルマリン)を用いたゲル濾過にかけることにより、分子重約1500~5000のペプチドを含む成分を乾燥重

量として2.95g得た。次に、このうち半量(1.48g)をセファデックスG-25のカラム(100, $7.5 \times 150 \text{ cm}$, フォルマリン)を用い、さらに分離し、各溶出成分を前記したF1Aを用いて抗CNP-22抗血清に対する免疫反応を調べた。

この結果、第1図に示すように、抗CNP-22抗血清に対し免疫反応を示す成分が2つに別れ(第1図、分子重約4000~5000のB成分と分子重約2000~3000のC成分)、抗CNP-22抗血清に反応するペプチドの存在量比はB成分とC成分が約4:3であった。なお、本発明をさらにすすめるべく、前記した抗CNP-22抗血清に含まれていることが判っている。本発明ではこのB成分を以下に示す方法でさらに精製した。

まず、前記した方法で分離した分子重約4000~5000のB成分(乾燥重量740mg)をC18(C8-22, $2.4 \times 52.3 \text{ cm}$, Whatman)イオン交換クロマト(溶出液A: 10mM HCOOH , (pH 6.0): CH_3CN :90:10 (V/V)、溶出液B: 0.6M HCOOH , (pH 6.0): CH_3CN :90:10 (V/V)、溶出条件: 溶出液AとBを用いた

逆相溶出方式、流速: 40 ml/h、成分サイズ: 2000/1000)でさらに分離し、各溶出成分の抗CNP-22抗血清に対する免疫反応を測定した。

この結果、第2図に示すように、フラクション番号93-102及び111-113に抗CNP-22抗血清に対する免疫反応が認められ、これらの成分をそれぞれ凍結乾燥した。次に、前記C18-52クロマトのフラクション番号111-113の成分(乾燥重量8.5mg)を統一メタノールを用いたイオン交換クロマトグラフィー(このカラムの作製に関しては本発明者等の報告に詳細に記載されている: Bada, S. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 142, 1055-1057, 1987)にかけ、カラムに吸着したペプチドを10% CH_3CN を含む1M酢酸溶液で溶出し、この溶出成分をC-18カラム(Ri-Pore RP-318, $4.6 \times 250 \text{ mm}$, Bio-Rad)を用いた逆相HPLC(流速: 1.5 ml/min , 溶出液: 8:9:CH₃CN:10% TFA:(A)90:10:1, (B) 40:60:1 (V/V)、溶出条件:

溶出液AとBを用いた逆相溶出方式、溶出時間: 120min)で分離・精製し、各溶出成分の抗CNP

-22抗血清に対する免疫反応を調べた。

この結果、第3図の免疫反応位置に、抗CNP-22抗血清に対し免疫反応を示す、かつ210nmのUV吸収が最大値を示す成分が得られた。

本発明における精製ペプチド(CNP-22)の最終精製は、前記C-18カラムクロマトで分離した成分(第3図の免疫)をさらに、ジブフェニルカラム(219TP54, $4.6 \times 250 \text{ mm}$, Vydac)を用いた逆相HPLC(流速: 1 ml/min , 溶出液: 8:9:CH₃CN:10:1TFA:(A)90:10:1, (B) 40:60:1 (V/V)、溶出条件: 溶出液AとBを用いた逆相溶出方式、溶出時間: 120min)で分離・精製し、各溶出成分を抗CNP-22抗血清に対する免疫反応を調べた。この結果、第4図に示すごとく、CNP-22抗血清に対し免疫反応を示すペプチドを、単一ピークを示すまで精製することにより、このペプチドをCNP-22と命名した。

なお、本発明における精製で得られるCNP-22の収量は、ブタ脳40gから約135mg(100mg)であった。

実施例3 C N P-53の構造決定

A C N P-53のアミノ酸一次配列の解析

実施例2で得たC N P-53の3/4量(約525 μg)をアミノ酸配列自動分析機(Applied Biosystems 473A/120A)に供し、エドマン分解法によりアミノ酸一次配列を分析した結果、第4図に示す結果が得られ、この結果よりC N P-53のN-末端から45番目までのアミノ酸一次配列は以下に示す配列であると決定した。ただし、この解析で37サイクル目のプアヒートアミノ酸は検出されないことから、本発明者は、このアミノ酸はシステイン残基と断定した。

- 8-Asp-Leu-Arg-Val-Asp-Thr-Lys-Ser-Arg-(1)
 (2)Ala-Gly-Trp-Gly-Arg-Leu-Leu-Gly-Gly-(3)
 (4)His-Pro-Asp-Gly-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-(5)
 (6)Gly-Asn-Lys-Lys-Gly-Leu-Ser-Lys-Gly-(7)
 (8)Cys-Phe-Gly-Leu-Lys-Leu-Asp-Arg-Ile-...
 (式中、(1)と(2)、(3)と(4)、(5)と(6)、及び(7)と(8)は直接結合している。)

なお、この解析で45サイクル目以後のプアヒート

33番位C N P-22抗原液に対する1分子あたりの免疫反応を求めたところ、C N P-53の構造をC N P-22をC-末端に含む55個のアミノ酸残基からなるペプチドとして求めた値は、C N P-22のそれと同等であった。

以上の解析結果から、本発明者はC N P-53の構造は以下のアミノ酸一次配列で示される新規ペプチドであると結論した。

- 8-Asp-Leu-Arg-Val-Asp-Thr-Lys-Ser-Arg-(1)
 (2)Ala-Gly-Trp-Gly-Arg-Leu-Leu-Gly-Gly-(3)
 (4)His-Pro-Asp-Gly-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-(5)
 (6)Gly-Asn-Lys-Lys-Gly-Leu-Ser-Lys-Gly-(7)
 (8)Cys-Phe-Gly-Leu-Lys-Leu-Asp-Arg-Ile-(9)
 (10)Gly-Ser-His-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys-...
 (式中、(1)と(2)、(3)と(4)、(5)と(6)、(7)と(8)及び(9)と(10)は直接結合しており、37位と53位のシステイン残基(Cys)は分子内でS-S結合を形成している。)

（式中、(1)と(2)、(3)と(4)、(5)と(6)、(7)と(8)及び(9)と(10)は直接結合しており、37位と53位のシステイン残基(Cys)は分子内でS-S結合を形成している。)

免疫の誘発

以上のように、本発明では、まず先に単離・同

定したC N P-53の構造を特異的に認識する抗体を調製し、これを用いたR I A系を構築した。次に、このR I A系を標準に、ブタ由来のC N P-22以外のC N Pファミリーに属する新規ペプチドを調製したところ、C N P-22とは異なる新規ペプチド(C N P-53)を唯一で特異的な反応までに検出することに成功した。

B C N P-53のN-末端アミノ酸一次配列と

C N P-22のアミノ酸一次配列の相違性の比較

実施例3のAで決定したC N P-53のN-末端から45番目までのアミノ酸一次配列を、先に決定したC N P-22のアミノ酸一次配列と比較したところ、第5図に示すように、C N P-53の46番目から48番目までのアミノ酸一次配列は、C N P-22のN-末端から14番目までのアミノ酸一次配列に完全に一致することが判った。

C C N P-53の抗原に免疫誘発活性

(chick red blood cell agglutinin)

ヒヨコ赤血球凝集活性はCurrie等の方法(Currie et al., Nature, 221, 1-13, 1963)に従って測定した。このアッセイ系でC N P-53はC N P-22と同等な結果を示した。

D C N P-53の抗C N P-22抗体液に対する免疫活性

実施例1で作成したR I A系を用い、C N P-

定したC N P-22の構造を特異的に認識する抗体を調製し、これを用いたR I A系を構築した。次に、このR I A系を標準に、ブタ由来のC N P-22以外のC N Pファミリーに属する新規ペプチドを調製したところ、C N P-22とは異なる新規ペプチド(C N P-53)を唯一で特異的な反応までに検出することに成功した。

さらに、このペプチドの構造解析を行い、C N P-53はC N P-22をC-末端に含むアミノ酸53個よりなるペプチドであることを明らかにし、このペプチドがC N Pファミリーに属する新規ペプチドであることを裏付けた。

本発明により、C N P-53の構造が明らかになったことから、今後C N P-53は化学合成または遺伝子操作を用い、大量に入手することが可能になり、これを用いて種々の免疫試験を行えば体内におけるC N P-53の生理的作用を明らかにすることができる。また、第5図に示すC N P-53のアミノ酸一次配列で1番目から32番目の間には、5個のリジン(Lys)残基(7, 24, 26, 30及び31番目)

と4番のアミノ酸(Asp)残基(13, 14及び23番目)が存在していることから、生体内において、CNDP-53はプロセッシング酵素により、これらの残基はアミノ酸残基のC-末端が特異的に切断を受け、CNDP-53以外にCNDP-22のN-末端となるアミノ酸が出現した種々のペプチド類(例えば、第8図に示すアミノ酸一次配列で4から53番目、9から53番目、10から53番目、15から53番目、24から53番目及び27から53番目に対応するペプチド)が生成され、これらが生体内においてCNDP-53、CNDP-22とは異なる抗原性を示す可能性が高い。これらの可能性は、本発明でCNDP-53の構造が明らかになったことから、これらのペプチド類を抗原として抗体を生成し、これらを用いて種々の菌種試験を行えば確かめることができる。さらに、CNDP-53のアミノ酸一次配列の情報から、CNDP-53に対応するDNAプロンプトを構築し、これを用いてCNDP-53をコードしている遺伝子及びcDNAを単離・解析すれば、CNDP-22、CNDP-53の

抗原性に対する免疫活性を示す。

第3図は、CNDP-53の菌種試験に用いた菌種マッピングの放出線図、及び各菌種の抗CNDP-22抗体に対する免疫活性を示す。なお、これは第2図のCNDP-22のロマトグラフィーの放出線分番号111-113をLKB-ウェーブマスター 165を用いたLKB-2151のロマトグラフィーにかけ、このシステムに吸着したペプチド成分を0.1% TFA-50% MeOHを用いてさらに精製したときの放出線図を示し、これは第3図の矢印の位置に放出するペプチド成分を、213 7554 Alpha 1 カラムを用いてさらに精製したときの放出線図を示す。

第4図は、CNDP-53のエドマン分析法による各サイクルごとに得るPTD-アミノ酸の吸収及びアミノ酸配列を示すグラフである。なお、各アミノ酸は一文字表記で表され、右よりはCNDP-53のエドマン分析における30-45サイクル目のPTD-アミノ酸吸収を4倍に拡大し、表示したものである。

第5図は、CNDP-53のN-末端から45番目ま

の菌種タンパクの構造を明らかにすることができる。従って、以上のことから、本発明は今後CNDPファミリーに属するペプチドの免疫抗原、生体内分布、及び生理作用を明らかにする上で、また、CNDPファミリーに属するペプチドを抗原として調製する上で、大いに貢献するものである。A. (菌種の菌名を説明)

第1図は、ブタ腎からの抽出物(CNDP-53成分をさらにSephadex G-50を用いて分離した分子重約1000-5000のペプチド成分)をSephadex G-25を用いてさらに精製したときの放出線図、及び各菌種の抗CNDP-22抗体に対する免疫活性を示すグラフである。なお、矢印1, 2, 3, 4, 5はこのカラムにおける1) Bovine serum albumin, 2) CNDP-22, 3) CNDP-20, 4) ウェーブマスター(4-28)及び5) deuteriumの放出位置を示す。

第2図は、第1図に示したB成分をCNDP-22イオン交換のロマトグラフィーを用いてさらに精製したときの放出線図、及び各菌種の抗CNDP-22

の抗体に対する免疫活性を示す図である。

第6図は、CNDP-53を含む菌種体をロードするcDNA配列を示す図である。

特許出願人 松 尾 泰 之

代理人 弁護士 湯 浅 孝 三

(外4名)

図 2

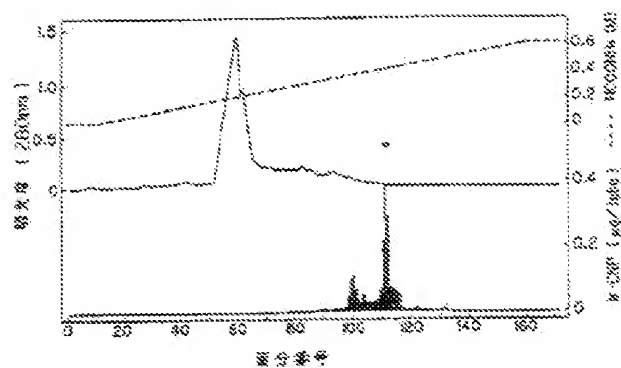


図 1

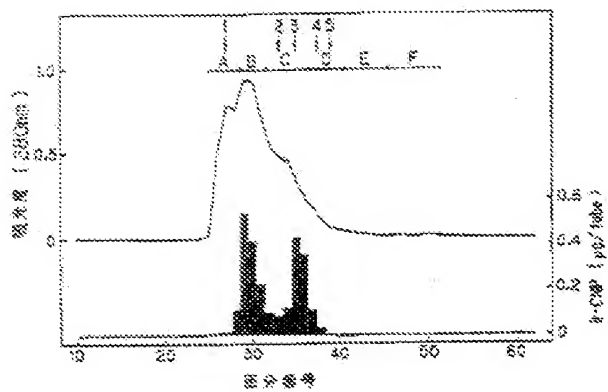


図 4

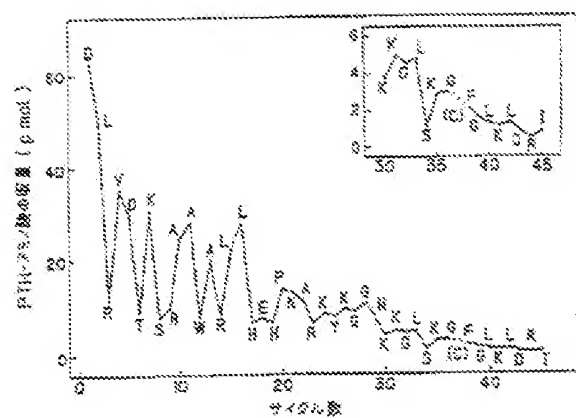
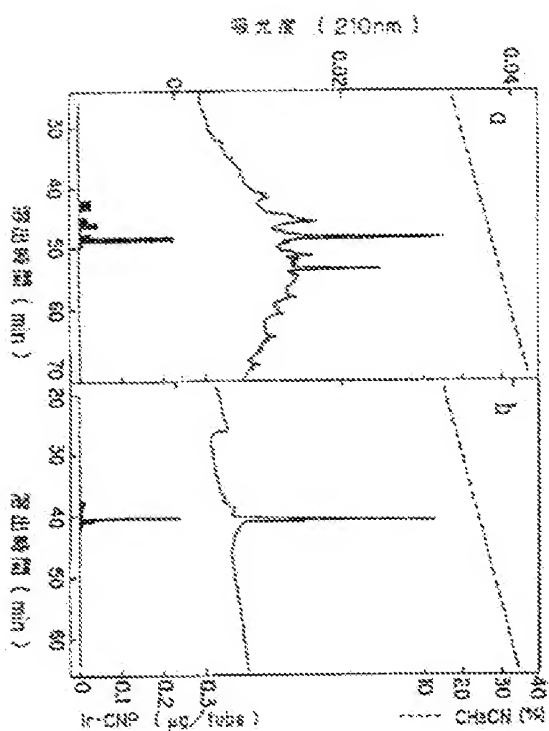
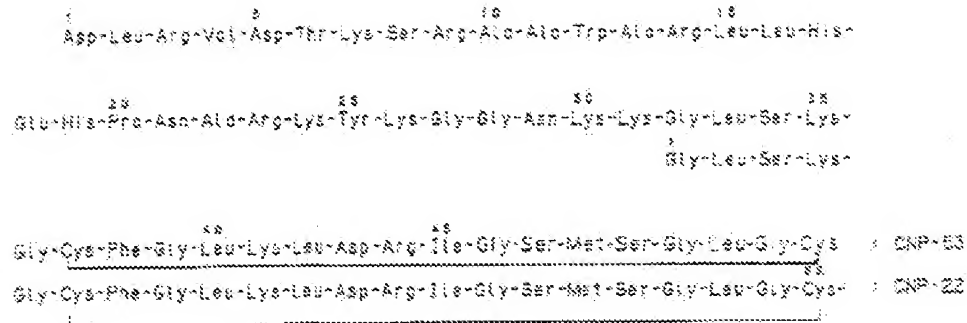


図 3



第 5 圖



第 6 圖

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--